

## ウシにおける子宮内細菌叢と分娩後の子宮環境および繁殖性との関連

八木沢拓也<sup>1†)</sup> 片桐成二<sup>2)</sup> 内山淳平<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> 北海道農業共済組合 道央統括センター 上川中央支所 美瑛家畜診療所

<sup>2)</sup> 北海道大学 獣医学研究院 獣医学部門 臨床獣医科学分野

<sup>3)</sup> 岡山大学 学術研究院医歯薬学域 病原細菌学分野

† 責任著者：八木沢 拓也

〒 071-0214 北海道上川郡美瑛町幸町 2 丁目 1 番 28 号

Tel : 0166-92-1852

FAX : 0166-92-4510

Email : takuya\_yagisawa\_in@nosai-do.or.jp

### 【要約】

ウシの低受胎は、生産性の低下に直接的につながることから畜産経営に与える影響は大きい。しかしながら、低受胎の原因は全て解明されているわけではない。細菌叢とは、特定の環境下で生息する様々な細菌の集合体のことをいう。近年、遺伝子解析技術の進歩により、子宮においても細菌叢の存在が明らかにされ、低受胎との関連性が示されはじめている。本報では、ウシの繁殖と子宮内細菌叢の関係について議論する。これまでに、子宮内細菌叢の研究は分娩後の子宮修復の時期と、任意待機期間以降の人工授精が行われる時期の2つに分けて行われてきた。第一に、分娩後の子宮修復の時期においては、子宮環境の変化に伴って子宮内細菌叢は劇的に変化する。周産期の負の栄養状態は、子宮における生体防御能は低下させ、子宮内細菌叢に異常を生じる。そのため、炎症性子宮疾患の発症に応じて子宮内細菌叢は異なり、子宮修復の遅延に関わることが示唆される。また、この分娩後早期の子宮内細菌叢の変化は子宮内膜の遺伝子発現の変化に長期的に関わる。第二に、任意待機期間以降の子宮環境は子宮修復完了とともに安定することから子宮内細菌叢も安定する。繁殖性との関連性を調査した研究では、子宮内細菌叢の違いが人工授精による受胎性と関連することが認められている。以上のことから、子宮内細菌叢はウシの繁殖に関連しており、低受胎の改善のために検査法として利用されることが期待される。

**キーワード：**子宮内細菌叢、子宮環境、子宮修復、繁殖性、低受胎

### 1. はじめに

牛群における低受胎牛の存在は、生産性を低下させることから畜産経営に与える影響は大きい。低受胎に至る原因は、管理要因（発情発見、飼料給与、牛舎環境など）から個体要因（生殖器疾患、蹄病など併発疾患、先天異常など）ま

で多岐にわたる [21]。また、これら要因に異常が認められない場合でも、受胎性が低下しているウシは一定の割合で存在しており、低受胎の対策を困難とさせている。そのため、低受胎の原因究明は、生産現場における長年の課題となっている。

細菌叢とは、特定の環境下で生息する様々な細菌の集合体のことをいう [3]。遺伝子解析技術の進歩により、従来の培養法では分離困難だった細菌が検出されるようになり、生体内に

受付：2024年4月26日

受理：2024年4月26日

においても細菌叢の存在が明らかにされた。特に腸内細菌叢は最も詳しく研究されており、100兆個にもわたる細菌が栄養の消化吸収に関わるだけでなく、代謝産物は全身の免疫、代謝、神経系の調節に間接的に作用する [15]。また、偏食やストレスなどの病的な状態は腸内細菌叢を構成する細菌のバランスに異常を生じ、生体にとって不利益な作用をもたらすことが示唆されている。腸内細菌叢の生体内への関わりに関しては少しずつ理解されはじめているが、他の器官における細菌叢の役割はまだ十分に理解されておらず、更なる検証が必要とされている。

これまで無菌と考えられてきた子宮内にも、菌量としては少ないが、細菌叢が存在することが明らかにされた [5]。ウシの子宮と膣の細菌叢との比較では、構成する細菌の種類は近似しているが、各菌の構成割合が異なるため [6]、子宮には独自の細菌叢を形成している可能性がある。子宮内細菌叢と受胎性に関わる研究は、特にヒトで進んでおり、不妊症のヒトの細菌叢は正常妊娠のヒトと比べて *Lactobacillus* 属の割合が低く、病原菌の割合が高い傾向にあることが分かっている [10, 14]。ウシにおいては、繁殖と子宮内細菌叢に関して研究はまだ始まったばかりである。

ウシの分娩後の子宮環境は、組織のリモデリングにより急激に変化する [4, 8]。炎症性子宮疾患を発症すると、子宮の修復は著しく遅延する [12, 19]。子宮修復後、子宮の大きさは正常に戻り、健全なウシの子宮環境は受胎に向けて安定する [4, 8]。このように、ウシの子宮内の環境は、時期により変化するため、分娩後の子宮修復の時期、子宮修復後の安定的な時期（任意待機期間以降）では、子宮内細菌叢は大きく異なると考えられる。そのため、牛の受胎性と子宮内細菌叢の相違を観察した研究は、分娩後の子宮修復時期と任意待機期間以降の2つの時期にわけて行われている。

本稿では、分娩後の子宮修復と任意待機期間以降の繁殖性の2つの時期における子宮内細菌叢の関わりについて最新の研究に焦点を当てて議論する。また、子宮内細菌叢の臨床応用の可能性についても言及する。

## 2. 分娩後の子宮環境と子宮内細菌叢の関わり

### (1) 分娩後の負のエネルギー状態と子宮内細菌叢

分娩後のウシの負のエネルギー状態は、子宮内膜における生体防御機能を低下させることから、子宮内細菌叢の変化に強く関わる [7, 18]。子宮の生体防御機能は、「抵抗性」と「耐性」の二つに分類できると論じられている [18]。ここでいう「抵抗性」とは、免疫応答により病原菌を排除する機構のことをいい、「耐性」とは粘膜バリアなどにより病原菌の組織への侵入を防ぐ機構のことをいう。周産期の負のエネルギー状態はこれら二つの機構を著しく低下させる。免疫応答においては、免疫細胞の主要なエネルギー源となるグルコースとグルタミンが減少することから、代謝ストレスにより免疫細胞の活性は著しく低下する。粘膜バリアにおいては、低栄養により粘液産生量の減少や細胞間のタイトジャンクションに構造変化がおきることによって防御機構が損なわれる。以上のことから、分娩後の負のエネルギー状態による生体防御機能の低下は、病原菌の組織への侵入および増加を許し、子宮内細菌叢に異常をきたす。

### (2) 分娩後の炎症性子宮疾患と子宮内細菌叢

分娩後の子宮環境は著しく変化しており、炎症性子宮疾患が発症すれば子宮の修復は遅延し、その後の繁殖成績に影響する [12]。子宮内細菌叢の分娩後の変化を経時的に遺伝子解析した研究では、炎症性子宮疾患の発症の有無に関係なく分娩後2日までは細菌叢の構成割合は同様であったが、分娩後6 ± 2で異なった変化をすることが認められた [9, 11]。正常な子宮修復を示すウシの子宮内細菌叢は *Proteobacteria* 門と *Tenericutes* 門が増加し、*Bacteroidetes* 門と *Fusobacteria* 門が減少していた。一方、炎症性子宮疾患を発症したウシの細菌叢の変化は正常なウシとは異なる変化を示すことが分かり、*Bacteroidetes* 門と *Fusobacteria* 門の細菌の過剰な増殖が炎症性病変の形成に寄与していると考えられた。種レベルでは *Bacteroides pyogenes*、*Porphyromonas levii*、*Helcococcus ovis* などの菌が病原性を示す菌として検出された。このように、分娩後に炎症性子宮疾患を発症する牛の子宮内

細菌叢は、特定の細菌が増加することから構成する細菌の多様性が失われ、細菌叢のバランスに変化が生じている [9, 16]。

### (3) 子宮環境の長期的な変化と子宮内細菌叢

分娩後早期の子宮内細菌叢の変化は、ウシの子宮内膜における遺伝子発現の変化に長期的に関わる。Moore らは、分娩後第1週で検出された子宮内細菌叢が分娩後第5週および9週の子宮内膜の遺伝子発現と関連することを認めた [13]。具体的には、分娩後第一週の子宮内細菌叢の変化は、第五週の子宮内膜における免疫応答および細胞の発育・分化に関わる遺伝子発現の変化に関連していた。免疫応答は炎症反応があることを意味し、さらに、細胞の発育・分化の活性の低下は子宮修復の遅延につながる。このことは、子宮内細菌叢が異常な個体において線維症と低形成などの子宮内膜の器質的な変化に関わる遺伝子発現が増加していたことから考えられた。また、第9週においても、継続的な免疫応答の変化が見られ、持続的な炎症状態にあることが示唆された。炎症性子宮疾患が改善された後でも、子宮の生理機能に影響が残ることは他の研究でも示されている [17]。したがって、分娩後早期の異常は一過性のものではなく、長期的に関わるため、適切な管理が求められる。

## 3. 子宮内細菌叢の繁殖性との関わり

### (1) 子宮内細菌叢と繁殖性の関連性に関するこれまでの研究

人工授精が開始される任意待機期間以降の子宮内細菌叢と繁殖性に関わる研究は行われ始めたばかりである。この時期の子宮環境は、正常な個体であれば分娩後の子宮修復が完了し、次の受胎に備えるため安定している [4, 8]。子宮

内細菌叢も安定する。[13]。そのため、繁殖性に関わる細菌叢の解析が可能となる。

繁殖性との関連性に関する先行研究の一つに、定時人工授精後の受胎性と子宮内細菌叢との関連性を解析した研究がある [1, 2]。この研究では、一農場で飼養される分娩後 80 ± 2 日の肉牛に対して発情同期化プログラム後を実施し、単回の人工授精による受胎の有無に応じた子宮内細菌叢の違いを子宮内灌流液を用いて解析した。解析の結果から、受胎性に応じて子宮内に形成される細菌叢の多様性は異なることが示された。また、不受胎牛においては、属レベルで *Corynebacterium* 属をはじめとする複数の病原性が示唆される細菌の構成割合の増加が検出された。これら細菌の子宮機能への影響は不明であるが、ヒトと同様にウシにおいても子宮内細菌叢と受胎性に関連が認められた。

### (2) ウシの子宮内細菌叢と繁殖性の関連性に関する臨床研究

子宮内細菌叢と繁殖性の関連性を適切に評価するには、ウシが受胎または長期不受胎に至るまでの繁殖成績をモニタリングすることが重要となる。また、農場ごとの飼養管理の違いが解析のための交絡因子となる可能性がある。上記の研究は、単一農場における単回の人工授精による受胎の有無に基づいて行われた。そのため、著者らは子宮内細菌叢と繁殖性の関連性に関して、農場間の違いと繁殖成績への長期的な影響に焦点を当てて更なる調査を行った。

4つの異なる酪農場（表1）で飼養されるホルスタイン種雌牛に対して、初回人工授精前に採取した子宮内細菌叢と繁殖性の関連性を解析した [20]。検体には子宮内膜組織を用いた。ウシの繁殖性の指標には、受胎までの人工授精の回数を使用した。

表1 供試農場の概要

農場	飼養頭数	飼養形態	給餌管理	研究に使用したウシの頭数
A	70	タイストール	分離給与	13
B	50	タイストール	購入 TMR	11
C	144	フリーバーン	自給 TMR	31
D	65	タイストール	購入 TMR	14

自給 TMR, 自家生産した粗飼料を用いて農場で調製した完全混合飼料 (Total Mixed Rations, TMR) ; 購入 TMR, TMR センターから購入した TMR; 分離給与, 粗飼料と濃厚飼料を別々に給与する給餌方法.

はじめに、4つの農場すべての供試牛に関して、受胎までの人工授精の回数と細菌叢との関連解析を行ったが、受胎までの人工授精の回数との関連性は検出できなかった。飼養管理が交絡因子となる可能性を考え、農場、飼養形、給餌管に関する細菌叢の関連解析を行った。その結果、農場、飼養形態、給餌管理の因子により細菌叢が異なることが示された(図1)。この結果は、子宮内細菌叢解析においては、環境の影響が大きいことを示唆している。

次に、4つの農場の中で供試牛の頭数が最も多かったC農場に焦点を当てて、子宮内細菌叢と繁殖性(受胎までの人工授精の回数)に関して再度解析を行った。その結果、細菌叢の多様性は受胎性と相関した。また、子宮内細菌叢のどの細菌が受胎性と関連しているか探索を

行った結果、流産の原因菌の近縁菌の *Arcobacter* 属菌が正の相関を示すことが明らかとなった(図2)。さらに、ウシの繁殖性と種々の細菌のバランスが関連している可能性を考え、細菌の存在量の相関関係を解析するために共起ネットワーク分析を行った。3回以内の授精で受胎したウシを正常受胎群に、4回以上の授精を受胎に要したウシを低受胎群に群分けして、解析を行ったところ、双方に有意な関係を検出した(図3)。以上の結果より、受胎性に応じて子宮内細菌叢のバランスが変化する可能性が考えられた。

本研究により、C農場の解析において、ウシの子宮内細菌叢が繁殖性に関連していることが示された。また、当農場における低受胎と *Arcobacter* 属菌を含む細菌のネットワークが相

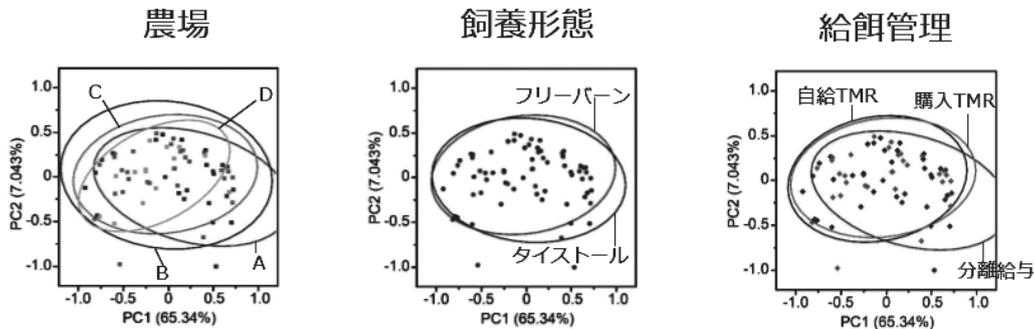


図1 農場、飼養形態、給餌管理の違いにおける細菌叢の比較  
それぞれの群間で有意差が確認された。

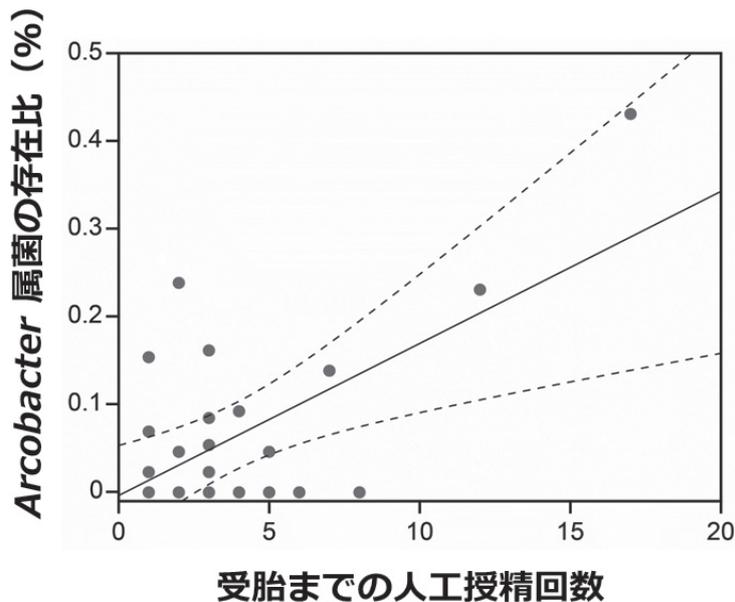


図2. C農場における *Arcobacter* 属菌の存在比と受胎までの人工授精回数との関係  
グラフに、正規直線と95%信頼区間を点線で示す。ドットは、各個体の存在比を表す。



図3 C農場における共起ネットワーク分析の結果  
正常な受胎性で優位な単位と低受胎で優位な単位を図中に示す。

関した。しかしながら、全農場をまとめた解析では有意な成績が得られず、ヒトで認められるようなウシに共通して繁殖性に相関する主要細菌を見出すまでには至らなかった。今後、検体数を増やして解析を行う必要がある。

#### 4. 子宮内細菌叢解析の臨床応用の可能性

以上の結果から、今後、子宮内細菌叢は子宮環境の評価を目的とした検査に臨床応用されることが期待される。はじめに、分娩後の子宮修復の評価についてである。炎症性子宮疾患に伴う子宮修復の遅延を、細菌叢の変化に基づいて評価する検査が提案できる。また、培養検査で分離できない原因菌も検出できることから、新しい細菌検査の形として原因菌の検出が可能となる。次に、繁殖性の評価についてである。低受胎牛を対象に、細菌叢の違いから子宮環境の変化を評価する検査が提案できる。ヒトにおいては、子宮内細菌叢解析は妊孕性の評価に利用され始めている。これと同様な検査がウシで実施可能であると考えられる。

#### 5. おわりに

ウシの低受胎の要因を明らかにし、対策することは畜産経営の持続化を図るうえで重要となる。近年の研究から子宮内細菌叢と繁殖との関連性が示されており、ウシの低受胎を改善するための新たな検査法となる可能性が期待される。今後、細菌叢解析が畜産分野で普及し、繁殖との関連性が明らかになり、応用されることを期待する。

#### 引用文献

- [1] Ault TB, Clemmons BA, Reese ST, Dantas FG, Franco GA, Smith TPL, Edwards JL, Myer PR, Pohler KG (2019) Bacterial taxonomic composition of the postpartum cow uterus and vagina prior to artificial insemination. *Journal of Animal Science* 97:4305-4313
- [2] Ault TB, Clemmons BA, Reese ST, Dantas FG, Franco GA, Smith TPL, Edwards JL, Myer PR, Pohler KG (2019) Uterine and vaginal bacterial community diversity prior to artificial insemination between pregnant and nonpregnant postpartum cows. *Journal of Animal Science* 97:4298-4304
- [3] Berg G, Rybakova D, Fischer D, Cernava T, Verges

- MC, Charles T, Chen X, Cocolin L, Eversole K, Corral GH, Kazou M, Kinkel L, Lange L, Lima N, Loy A, Macklin JA, Maguin E, Mauchline T, McClure R, Mitter B, Ryan M, Sarand I, Smidt H, Schelkle B, Roume H, Kiran GS, Selvin J, Souza RSC, van Overbeek L, Singh BK, Wagner M, Walsh A, Sessitsch A, Schloter M (2020) Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome* 8:103
- [4] Chapwanya A, Meade KG, Foley C, Narciandi F, Evans AC, Doherty ML, Callanan JJ, O'Farrelly C (2012) The postpartum endometrial inflammatory response: a normal physiological event with potential implications for bovine fertility. *Reprod Fertil Dev* 24:1028-1039
- [5] Chen C, Song X, Wei W, Zhong H, Dai J, Lan Z, Li F, Yu X, Feng Q, Wang Z, Xie H, Chen X, Zeng C, Wen B, Zeng L, Du H, Tang H, Xu C, Xia Y, Xia H, Yang H, Wang J, Wang J, Madsen L, Brix S, Kristiansen K, Xu X, Li J, Wu R, Jia H (2017) The microbiota continuum along the female reproductive tract and its relation to uterine-related diseases. *Nat Commun* 8:875
- [6] Clemmons BA, Reese ST, Dantas FG, Franco GA, Smith TPL, Adeyosoye OI, Pohler KG, Myer PR (2017) Vaginal and uterine bacterial communities in postpartum lactating cows. *Front Microbiol* 8:1047
- [7] Comlekcioglu U, Jezierska S, Opsomer G, Pascottini OB (2024) Uterine microbial ecology and disease in cattle: A review. *Theriogenology* 213:66-78
- [8] Dai T, Ma Z, Guo X, Wei S, Ding B, Ma Y, Dan X (2023) Study on the Pattern of Postpartum Uterine Involution in Dairy Cows. *Animals (Basel)* 13
- [9] Galvao KN, Bicalho RC, Jeon SJ (2019) Symposium review: The uterine microbiome associated with the development of uterine disease in dairy cows. *J Dairy Sci* 102:11786-11797
- [10] Hashimoto T, Kyono K (2019) Does dysbiotic endometrium affect blastocyst implantation in IVF patients? *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 36:2471-2479
- [11] Jeon SJ, Vieira-Neto A, Gobikrushanth M, Daetz R, Mingoti RD, Parize AC, de Freitas SL, da Costa AN, Bicalho RC, Lima S, Jeong KC, Galvao KN (2015) Uterine Microbiota Progression from Calving until Establishment of Metritis in Dairy Cows. *Appl Environ Microbiol* 81:6324-6332
- [12] LeBlanc SJ, Duffield TF, Leslie KE, Bateman KG, Keefe GP, Walton JS, Johnson WH (2002) Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis and its impact on reproductive performance in dairy cows. *J Dairy Sci* 85:2223-2236
- [13] Moore SG, Ericsson AC, Behura SK, Lamberson WR, Evans TJ, McCabe MS, Pook SE, Lucy MC (2019) Concurrent and long-term associations between the endometrial microbiota and endometrial transcriptome in postpartum dairy cows. *BMC Genomics* 20
- [14] Moreno I, Garcia-Grau I, Perez-Villaroya D, Gonzalez-Monfort M, Bahceci M, Barrionuevo MJ, Taguchi S, Puente E, Dimattina M, Lim MW, Meneghini G, Aubuchon M, Leondires M, Izquierdo A, Perez-Olgiati M, Chavez A, Seethram K, Bau D, Gomez C, Valbuena D, Vilella F, Simon C (2022) Endometrial microbiota composition is associated with reproductive outcome in infertile patients. *Microbiome* 10:1
- [15] Nishijima S, Suda W, Oshima K, Kim SW, Hirose Y, Morita H, Hattori M (2016) The gut microbiome of healthy Japanese and its microbial and functional uniqueness. *DNA Research* 23:125-133
- [16] Pascottini OB, Van Schyndel SJ, Spricigo JFW, Rousseau J, Weese JS, LeBlanc SJ (2020) Dynamics of uterine microbiota in postpartum dairy cows with clinical or subclinical endometritis. *Sci Rep* 10:12353
- [17] Pereira G, Guo Y, Silva E, Silva MF, Bevilacqua C, Charpigny G, Lopes-da-Costa L, Humblot P (2022) Subclinical endometritis differentially affects the transcriptomic profiles of endometrial glandular, luminal, and stromal cells of postpartum dairy cows. *J Dairy Sci* 105:6125-6143
- [18] Sheldon IM, Cronin JG, Bromfield JJ (2019) Tolerance and Innate Immunity Shape the Development of Postpartum Uterine Disease and the Impact of Endometritis in Dairy Cattle. *Annu Rev Anim Biosci* 7:361-384
- [19] Wagener K, Gabler C, Drillich M (2017) A review of the ongoing discussion about definition, diagnosis and pathomechanism of subclinical endometritis in dairy cows. *Theriogenology* 94:21-30
- [20] Yagisawa T, Uchiyama J, Takemura-Uchiyama I, Ando S, Ichii O, Murakami H, Matsushita O, Katagiri S (2023) Metataxonomic analysis of the uterine microbiota associated with low fertility in dairy cows using endometrial tissues prior to first artificial insemination. *Microbiol Spectr* 11:e0476422
- [21] Yusuf M, Nakao T, Ranasinghe RMSBK, Gautam G, Long ST, Yoshida C, Koike K, Hayashi A (2010) Reproductive performance of repeat breeders in dairy herds. *Theriogenology* 73:1220-1229

## The association of uterine microbiota with postpartum uterine environment and reproductivity in cows

Takuya Yagisawa<sup>1†)</sup>, Seiji Katagiri<sup>2)</sup>, Jumpei Uchiyama<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> Hokkaido Agriculture Mutual Aid Association, Sapporo, Japan

<sup>2)</sup> Laboratory of Theriogenology, Department of Clinical Sciences,  
Faculty of Veterinary Medicine, Hokkaido University, Hokkaido, Japan

<sup>3)</sup> Department of Bacteriology, Graduate School of Medicine Dentistry and  
Pharmaceutical Sciences, Okayama University, Okayama, Japan

† Correspondence author: Takuya Yagisawa 2-1-28,  
Saiwaicho, Biei-cho Kamikawa-gun, Hokkaido, 071-0214, Japan

TEL: 0166-92-1852

FAX: 0166-92-4510

Email : takuya\_yagisawa\_in@nosai-do.or.jp

### [Abstract]

Because low fertility in cows diminishes productivity, farms incur substantial economic losses. However, not all factors contributing to low fertility are fully understood. Advances in genetic analysis technology have identified the presence of uterine microbiota and its association with low fertility has become a concern. The microbiota is defined as a collective of microorganisms that exist in a particular environment. This paper discusses the associations between uterine microbiota and the reproduction of cows. Studies on uterine microbiota have been conducted in two distinct phases: the postpartum period for uterine involution and the period following the voluntary waiting period when artificial insemination is initiated. Firstly, regarding uterine involution, uterine microbiota undergoes dramatic changes in response to alterations in the postpartum uterine environment. The establishment of uterine microbiota is influenced by the postpartum nutritional energy state, and its balance is disrupted by negative energy balance. The occurrence of inflammatory uterine disease is associated with variations in uterine microbiota, resulting in delay in uterine involution. This early postpartum change in the uterine microbiota is responsible for long-term changes in the endometrium. Secondly, concerning reproductivity after the voluntary waiting period, the uterine environment stabilizes upon the completion of uterine involution. Relatedly, uterine microbiota also becomes stable. The reported studies observed uterine microbiota to differ according to subsequent fertility. In conclusion, uterine microbiota plays a crucial role in the reproduction of cows and is expected to become the novel examination technique for low fertility.

**Keywords:** low fertility, uterine environment, uterine microbiota, uterine involution, reproductivity